

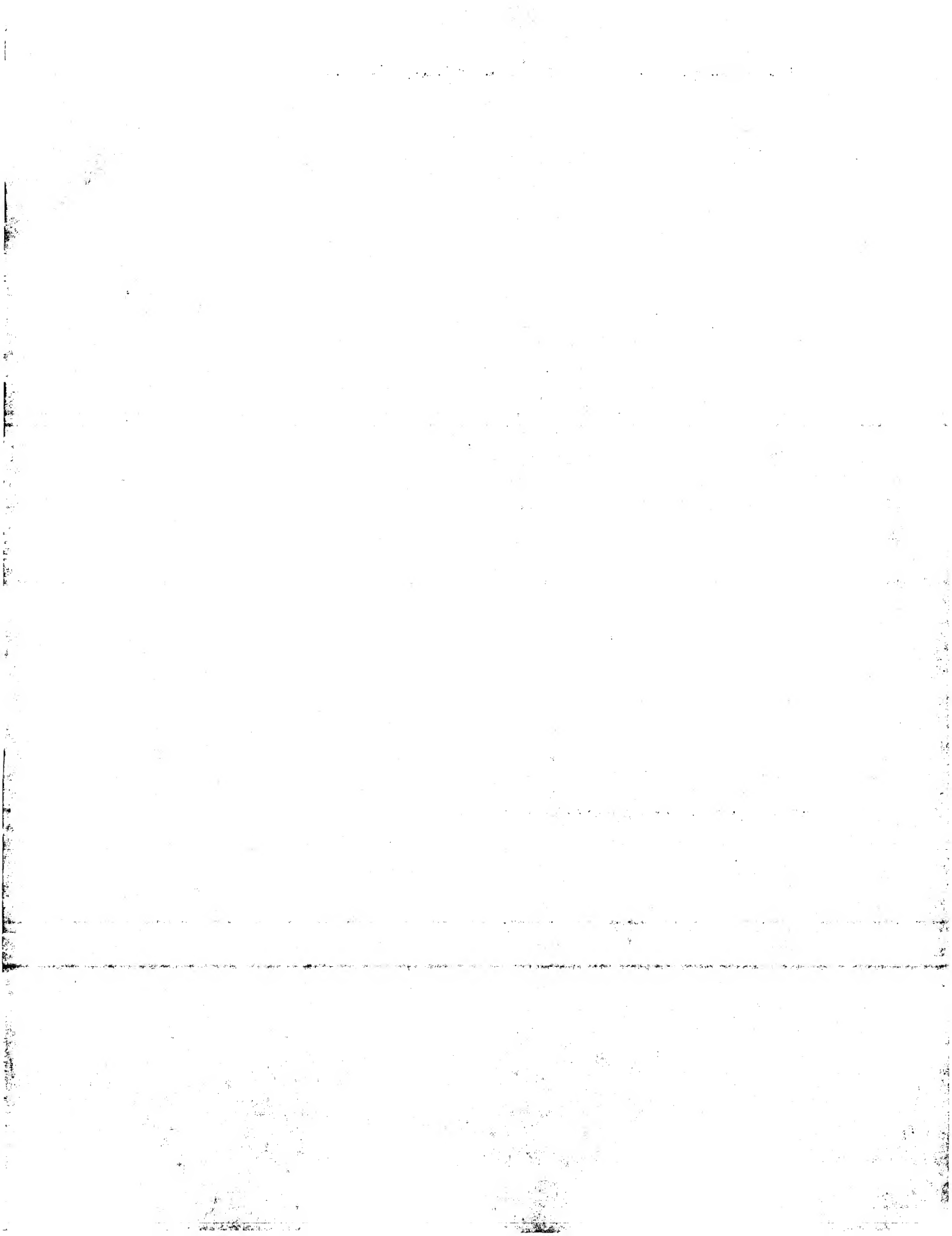
专利号: 98114663.5 授权公告号: CN 1062565C

重组人  $\alpha$  型复合干扰素及其制备方法和用途

Preparation method and application of recombinant human consensus interferon- $\alpha$

Abstract:

The present invention relates to preparation method and application of recombinant human consensus interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ F). The universal formula of INF- $\alpha$ F is " Arg<sup>22</sup> Ala<sup>76</sup> Asp<sup>78</sup> Glu<sup>79</sup> Tyr<sup>86</sup> Tyr<sup>90</sup> Leu<sup>96</sup> Thr<sup>156</sup> Asn<sup>157</sup> ". The site 158<sup>th</sup> was designed as Val which peculiar to the HAN nationality in China. The INF- $\alpha$ F can used in treatment of diseases like hepatitis B, hepatitis C etc. Comparing with present interferon, INF- $\alpha$ F has the characteristics of higher activity and rate of virus elimination, lower side-effect and especially suite for treatment for yellow race.



附建 附 7a 授权文本

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/56

C12N 15/10

## [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98114663.5

[45] 授权公告日 2001 年 2 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1062565C

[22] 申请日 1998.6.29 [24] 颁证日 2001.1.13

[21] 申请号 98114663.5

[73] 专利权人 深圳九先生物工程有限公司

地址 518029 广东省深圳市银湖南方制药厂内

[72] 发明人 赵新先 王金锐 吉坤美

徐冰 李岱

[56] 参考文献

US4897471 1990.1.30 C07H21/04

<< 自然科学进展 >> 1992, 第 2 期 1992.1.1 孟枫等, 一种型干扰素基因新型中的发现鉴定表达及表达产物的纯化

审查员 黄赤

[74] 专利代理机构 深圳市专利服务中心

代理人 成义生

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 重组人  $\alpha$  型复合干扰素及其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明涉及一种重组人  $\alpha$  型复合干扰素及其制备方法和用途, 人  $\alpha$  型复合干扰素通过人  $\alpha$  型复合干扰基因的人工构建, 并由含其 DNA 序列表达载体的宿主细胞经发酵及纯化处理而制得, 其通式为 ( $\text{Arg}^{22} \text{Ala}^{76} \text{Asp}^{78} \text{Glu}^{79} \text{Tyr}^{86} \text{Tyr}^{90} \text{Leu}^{96} \text{Thr}^{156} \text{Asn}^{157} \text{Val}^{158}$ ) INF- $\alpha$ F。其中第 158 位设计成中国汉族人特有的 Val 密码子。本发明的药物用于乙型肝炎、丙型肝炎等病毒性疾病的治疗。与现有  $\alpha$  干扰素基因工程药物相比, 具有活性更高、副反应更小、病毒清除率更高、更适合于黄种人治疗等特点。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

## 权 利 要 求 书

1. 一种重组人  $\alpha$  型复合干扰素, 其特征在于, 其编码的蛋白质的氨基酸序列如下:

|            |            |            |
|------------|------------|------------|
| CDLPQTHSLG | NRRALILLAQ | MRRISPFSC  |
| 10         | 20         | 30         |
| KDRHDFGFPQ | EEFDGNQFQK | AQAISVLHEM |
| 40         | 50         | 60         |
| IQQTFNLFST | KDSSAAWDES | LLEKFYTELY |
| 70         | 80         | 90         |
| QQLNDLEACV | IQEVGVEETP | LMNVDSILAV |
| 100        | 110        | 120        |
| KKYFQRITLY | LTEKKYSPCA | WEVVRAEIMR |
| 130        | 140        | 150        |
| SFSLSTNVQE | RLRRKE     |            |
| 160        | 166        |            |

其中, 第 158 位为汉族人特有的 Val 密码子。

2. 一种重组人  $\alpha$  型复合干扰素的制备方法, 包括编码如权利要求 1 所述的人  $\alpha$  型复合干扰素基因的人工构建, 并由含其 DNA 序列表达载体的宿主细胞经发酵及纯化处理而制得。

## 说 明 书

---

### 重组人 $\alpha$ 型复合干扰素及其制备方法和用途

本发明涉及一种干扰素及其制备方法和用途，特别是涉及一种高效低毒的重组人  $\alpha$  型复合干扰素及其制备方法和用途。

干扰素是一类具有广谱的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节的生物活性的细胞素总称。哺乳动物的干扰素均有  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  等三个型别。其中  $\alpha$  型中可分为许多亚型，可分为两大家族。其中人干扰素的  $\alpha$  I 型约有 20 个基因成员，其中大部分都编码功能蛋白。

1986 年美国 FDA 首先批准基因工程  $\alpha$  2a 干扰素 (Roche 公司生产) 和  $\alpha$  2b 干扰素 (Schering 公司生产) 投放市场; 基因工程  $\beta$ 、 $\gamma$  干扰素也相继获准上市。我国科学家首创  $\alpha$  1b 干扰素已于 1996 年正式获准上市。

经临床大量研究表明，干扰素尤其  $\alpha$  型是一种重要的抗病毒、抗肿瘤治疗药物。但现有  $\alpha$  干扰素制剂的临床治疗效果尚不理想，存在着大剂量时副作用较大等缺点。

为此美国 Amgen 公司采用蛋白质工程技术根据 1983 年已报道的 13 种  $\alpha$  型干扰素的基因序列同源性，设计出一个全新的蛋白质工程药物——INFERGEN，并经 FDA 批准 1997 年在美国上市，用以治疗丙型肝炎，其疗效提高，且副作用低。

1995 年中国科学家候云德等发现中国汉族人  $\alpha$  干扰素等位基因的新变种: Va 1<sup>158</sup> IFN- $\alpha$  1。此发现对于开发适合中国汉族人特点的基因工程药

物具有重要意义。

本发明的目的在于将汉族人特有的基因位点引入  $\alpha$  干扰素基因工程药物中，而提供一种活性更高、副反应更小、病毒清除率更高、更适合于黄种人治疗用的人  $\alpha$  型复合干扰素及其制备方法；本发明的目的还在于将该干扰素用于病毒性疾病的治疗。

为实现上述目的，本发明提供一种重组人  $\alpha$  型复合干扰素及其制备方法和用途。

本发明通过比较现已公布的 20 多种人  $\alpha$  型干扰素的基因序列同源性并应用 DNA 重组技术设计制备人  $\alpha$  型复合干扰素，其编码的蛋白质的氨基酸序列如下：

|            |            |            |
|------------|------------|------------|
| CDLPQTHSLG | NRRALILLAQ | MRRISPFSCS |
| 10         | 20         | 30         |
| KDRHDFGFPQ | EEFDGNQFQK | AQAISVLHEM |
| 40         | 50         | 60         |
| IQQTFNLFST | KDSSAAWDES | LLEKFYTELY |
| 70         | 80         | 90         |
| QQLNDLEACV | IQEVGVEETP | LMNVDSILAV |
| 100        | 110        | 120        |
| KKYFQRITLY | LTEKKYSPCA | WEVVRAEIMR |
| 130        | 140        | 150        |
| SFSLSTNVQE | RLRRKE     |            |
| 160        | 166        |            |

其中，第 158 位为汉族人特有的 Val 密码子。

该重组人  $\alpha$  型复合干扰素，其表达载体含有与所述的编码氨基酸相应的 DNA 序列。

所述的表达载体可采用 pTrc6、pEt 等。

其表达载体的宿主细胞包括细菌、昆虫细胞及哺乳动物细胞。

本发明的人  $\alpha$  型复合干扰素可以如下通式表示：

$(\text{Arg}^{22} \text{Ala}^{76} \text{Asp}^{78} \text{Glu}^{79} \text{Tyr}^{86} \text{Tyr}^{90} \text{Leu}^{96} \text{Thr}^{156} \text{Asn}^{157} \text{Val}^{158}) \text{INF-}\alpha \text{F}$ 。

式中 INF- $\alpha$ F 为天然干扰素，第 158 位设计成中国汉族人特有的 Val 密码子。

本发明提供了该重组人  $\alpha$  型复合干扰素的制备方法，该方法包括人  $\alpha$  型复合干扰基因的人工构建，并由含其 DNA 序列表达载体的宿主细胞经发酵及纯化处理而制得。

由上述制备方法制取的人  $\alpha$  型复合干扰素可用于乙型肝炎、丙型肝炎等病毒性疾病。

本发明的人  $\alpha$  型复合干扰素药物比  $\alpha$  1b 生物学活性提高了 10 倍，清除丙型肝炎病毒率达 30% 多，尤其在  $\alpha$  1b 和  $\alpha$  2a 干扰素治疗失败后仍有效。与美国 FDA1997 年报道上市的 INFERGEN 临床效果一致，但副反应更低。这表明本研究制备的蛋白工程药物由于引入了汉族人特有的基因位点，更适合于黄种人治疗用。

下面通过本发明的一个优选实施例，对本发明作更详细的描述。

#### 一、人 $\alpha$ 复合干扰基因构建

根据本发明的人  $\alpha$  型复合干扰素编码的蛋白质的氨基酸序列选择大肠杆菌偏爱密码子、消除不利于表达的二级结构设计并考虑到密码子的简并性，而设计出如下优选的 DNA 序列：

Nde I

CAT ATG TGT GAT TTA CCG CAA ACT CAC TCT CTC GGT AAC

CGT CGT GCT CTG ATT CTG CTG GCT CAA ATG CGC CGC ATT

AGC CCG TTT AGC TGC CTG AAG GAT CGC CAT GAT TTT

GGT TTT CCG CAA GAA GAA TTT GAT GGT AAC CAG

TTT CAG AAG GCA CAG GCT ATT TCT GTA CTG CAT

GAA ATG ATC CAA CAG ACC TTC AAC CTG TTC TCT

ACT AAG GAT AGC TCT GCT GCA TGG GAC GAA AGC

CTG CTG GAG AAA TTC TAC ACC GAA CTC TAT CAG

CAG CTG AAC GAT CTC GAA GCA TGC GTA ATC CAG

GAA GTA GGT GTA GAA GAG ACT CCA CTC

ATG AAC GTC GAC TCT ATT CTG GCT GTT



AAG AAA TAC TTC CAG CGT ATT

ACC CTG TAC CTG ACT GAA AAA AAA TAT

TCT CCG TGC GCT TGG GAA GTA GTT CGT

GCT GAA ATT ATG CGT TCC TTC TCT CTG

TCT ACT AAC GTT CAA GAG CGT CTG CGT AAG

PST I

GAA TAA TAG CTG CAG

STOP

根据上述设计的 DNA 序列，分别合成 8 个 DNA 片段，其长度在 80bp 左右，这八个片段依次重叠，重叠部分在 20bp 左右使其退火温度在 62℃～66℃之间。再合成两个片段在 20 bp 左右的上游引物和下游引物，分别与 5' 端和 3' 端配对，且分别包含 Nde I 和 Pst I 两个限制性酶切位点。第一次 PCR 反应体系包括：4pmol 八个片段，0.2mM dNTPs，2 units Deep Vent 耐热聚合酶及缓冲液，反应体积为 100 μ l。80℃热启动，95℃30s，59℃30s，72℃1min10s 30 个循环。取反应液 1/10 作第二次 PCR 的模板，上游引物和下游引物各取 100pmol，0.25mM dNTPs，2 units Deep Vent 耐热聚合酶及缓冲液，反应体积为 100 μ l，反应条件同第一次，只减少到 25

个循环。PCR产物经电泳分离回收500bp大小位置的带，经纯化后双酶切(Nde I +Pst I)。本例中优选 pTrc6 为表达载体 (Trc 启动子，非融合表达，Lac I 调控)，同时用 Nde I 和 Pst I 双酶切，将复合干扰素基因克隆至 pTrc6。转化 *E. coli* JM109，筛选重组子。重组子经 DNA 序列分析挑选到一个含正确编码的序列的克隆。命名为 pTrcINF。

## 二、人 $\alpha$ 型复合干扰素的制备

### 1、工程菌株的表达与发酵

本例中优选将大肠菌为宿主细胞，将工程菌株大肠菌 JM109(pTrcINF) 单菌落挑在200mL LB加 100  $\mu$  g/mL氨苄液体培养基35℃振荡培养(150rpm)过夜，再分别取 20ml 作种子液转种至 1L LB 加 100  $\mu$  g/ml 氨苄和 0.4% 的葡萄糖中，振荡(200rpm)4 小时，37℃，OD 至 0.6 时加 IPTG 0.2mM 诱导 3hr，离心收菌。经 SDS-PAGE 检测，表达量达 20%。5 升摇瓶收集的菌体湿重为 12g。

### 2、复合干扰素纯化：

离心收集发酵的菌体经溶菌酶处理后，超声破菌，3500g 离心得到包涵体。包涵体经 Berol 185、TE 等洗涤。纯化后的包涵体经 7M 盐酸胍、100mM  $\beta$ -巯基乙醇、25mM Tris-Cl, 1mMEDTA (PH8.0) 溶解 3hr(20℃)。然后用 20mM Tris-HCl (pH8.0)，GSH:GSSG=1mM: 0.1mM 稀释 10 倍，对 20mM Tris-HCl, (pH8.0) 透析，除去盐酸胍和  $\beta$ -巯基乙醇。

图 1-3 给出了层析图谱，离心上清经 SOURCE 15Q、疏水层析和 Superdex 75 分子筛层析得到半成品，分装封口为成品。

## 三、复合干扰素的应用

本发明的复合干扰素主要用于病毒性疾病的治疗，对滤泡性口炎病毒，单纯疱疹病毒、麻疹病毒、EB 病毒等都有抑制繁殖作用。以 WISH 细胞 / VSV 系统进行抗病毒活性检测，结果分别为：国产天然干扰素为  $0.9 \times 10^8 \text{ U / mg}$ ，INTRON 为  $2.0 \times 10^8 \text{ U / mg}$ ，复合干扰素为  $9 \times 10^8 \text{ U / mg}$ ，其抗病毒活性明高于前二者。

#### 四、复合干扰素的临床治疗效果与副反应：

用复合干扰素治疗经临床证实为慢性活动性乙肝患者 67 例，每次 900 万单位，每 2 天 1 次，连续 6 个月，肌肉注射。治疗后有 70% 患者临床显效，其中 13 例 HBs 抗原阴转 (19%)，41 例 HBe 抗原阴转 (61%)，10 例 HBe 抗体阳转 (14%)，27 例 HBV-DNA 阴转 (40%)，48 例肝功恢复正常 (71%)。

用复合干扰素治疗丙型肝炎患者 42 例，每次 900 万单位，每周 3 次，连续 6 个月，肌肉注射。治疗后 69% 患者有临床效果，其中 16 例丙肝病毒-RNA 阳转 (38%)，29 例肝功恢复正常 (69%)。

复合干扰素的临床最大耐受量最可达每次 1500 万单位，常规用 900 万单位，临床约有不足 40% 患者表现出 I - II 级 (WHO 临床分级标准) 的副反应，包括  $38^\circ\text{C}$  以下的轻微发热、恶心、食欲不振。如仅采用每次 300 万单位的剂量时，则几乎无临床副反发生。

#### 五、复合干扰素与其它同类药的比较：

1、疗效：国外进口 INTRON 及国产天然干扰素常规剂量为每次 300 万单位。以治疗丙肝为例，治疗后病毒 RNA 阴转率只有 10%，肝功恢复正常者约 40%。复合干扰素与之相比，在相同剂量下可与其达到相同疗效，如提高剂量，则可明显提高疗效。

2、副作用:INTRON 等使用后, 40%患者表现出 II 级副反应, 包括流感样症状, 消化系统不适, 皮疹等症状; 复合干扰素在相同剂量下, 几乎无临床副作用, 即使剂量增加 2 倍, 其副反应发生率也仅有不足 40%且反应程度较轻, 在 0 - I 级范围内。

3、其它:使用国产天然干扰素治疗丙型肝炎失败后, 改用复合干扰素治疗 21 例患者中 15 例患者有临床反应(70%), 10 例肝功能恢复正常(47%)

图 1 为本发明的 SOURCE 15Q 层析洗脱图谱。

图 2 为本发明的疏水层析洗脱图谱。

图 3 为本发明的 SUPERDEX 75 层析洗脱图谱。

# 说明书附图

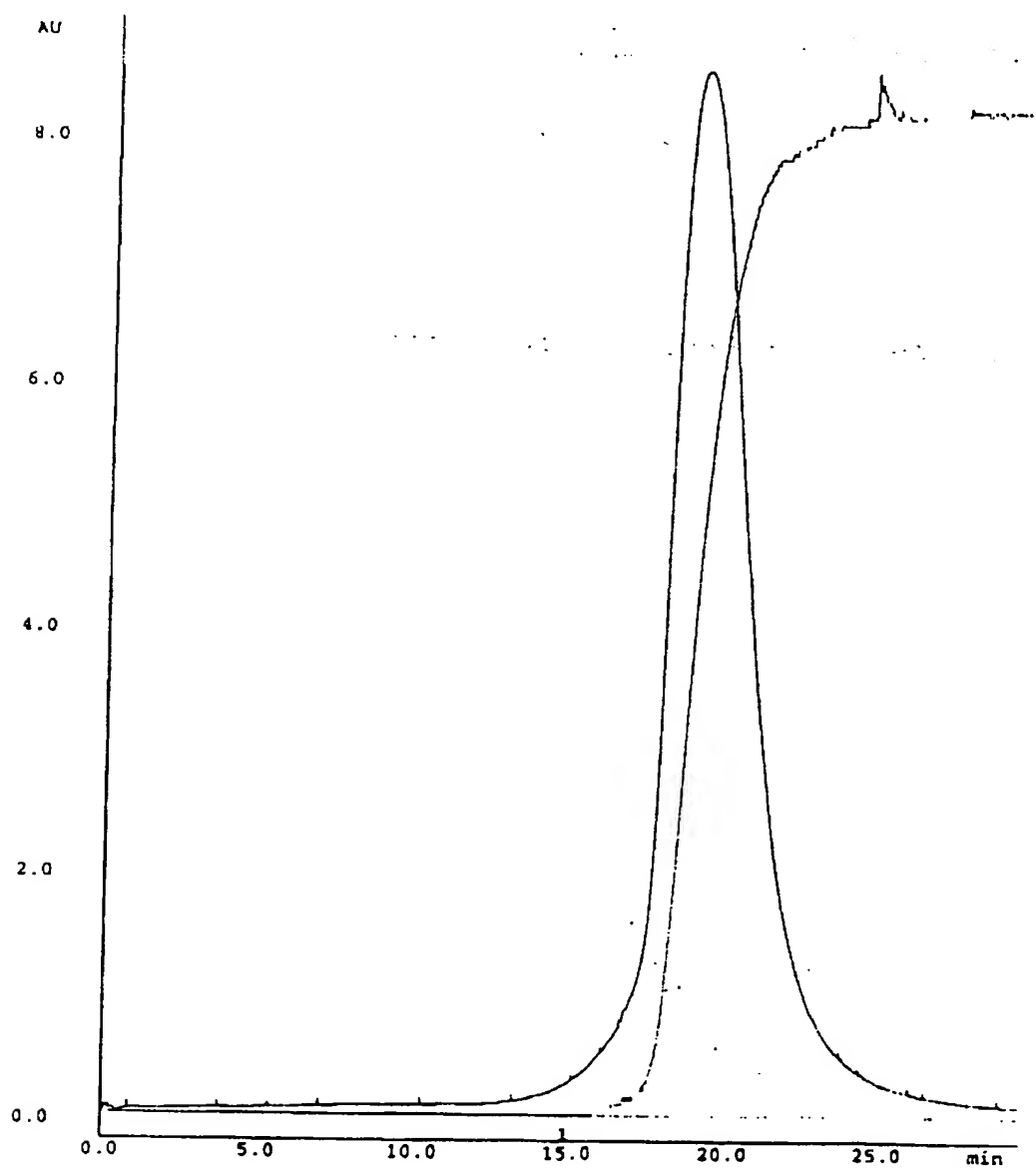


图 1

# 说明书附图

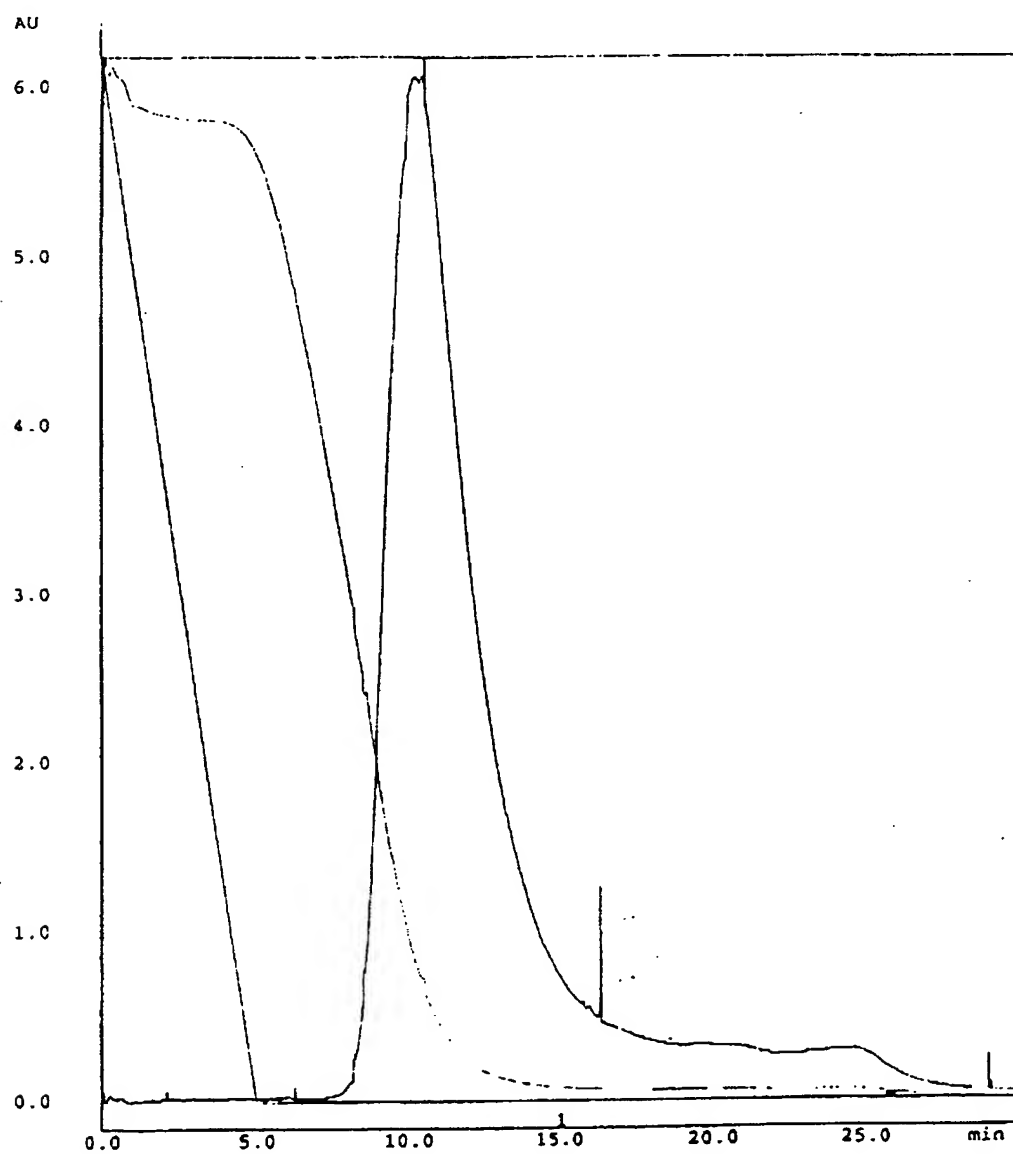


图 2

# 说明书附图

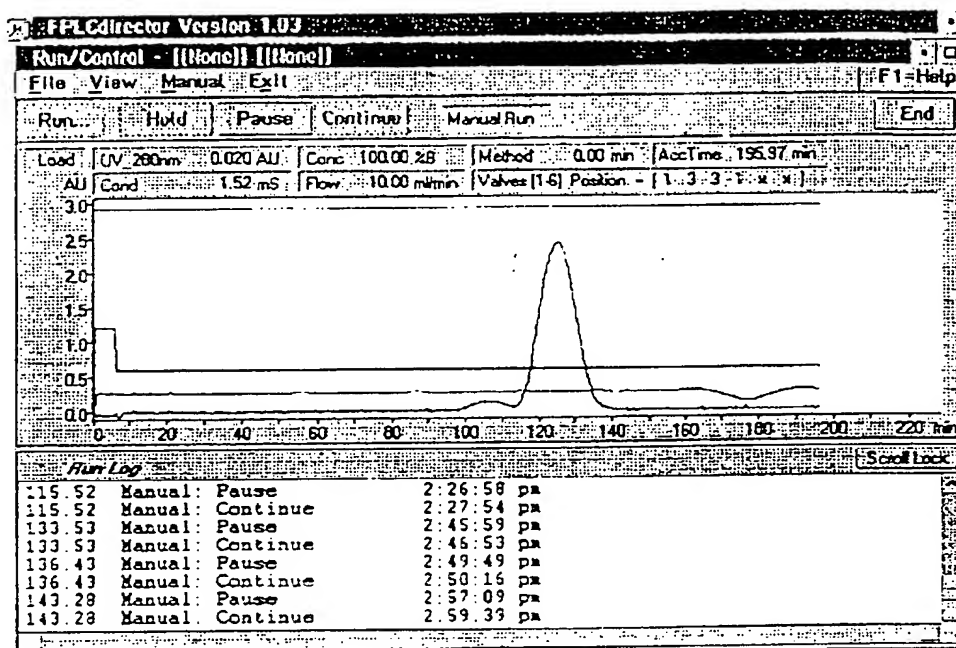


图 3

